

## بررسی تنوع ژنتیکی مارکر D9S1837 واقع در ژن TMC1 در جمعیت ایرانی

سمیرا معتمدی<sup>۱</sup>، مرتضی هاشم زاده چالشتی<sup>۱</sup>، مرجان مجتبوی نائینی<sup>۲</sup>، حسین تیموری<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۰

### چکیده:

زمینه و هدف: جهش‌های ژن TMC1 یکی از فراوان‌ترین دلایل ناشنوایی غیرسندرومی اتوزومی مغلوب در جمعیت‌های مختلف می‌باشد. با توجه به اندازه بزرگ این ژن و جهش‌های زیاد شناخته شده در آن، استفاده از مارکرهای چند جهت تشخیص ناقلین و تشخیص پیش از تولد پیشنهاد می‌شود. در مطالعه حاضر، اطلاع‌دهندگی مارکر D9S1837 با توالی‌های تکراری CA، در پنج قوم مختلف جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، جایگاه ژنی D9S1837 واقع در ژن TMC1 توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) و سپس الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید (PAGE) و در نهایت الکتروفورز فلورسنت موئنه تعیین ژنوتیپ گردید. فرکانس آللی، درجهی هتروزیگوسیتی و نتایج حاصل از ژنوتیپ‌های ۱۶۵ فرد سالم غیرخویشاوند توسط نرم‌افزارهای GeneMarker HID، Microsatellite Tools، و GenePop محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از برنامه GenePop، ۱۱ آلل در جمعیت ایرانی را نشان می‌دهد که بیشترین فراوانی مربوط به آلل ۲۳۹ جفت باز با فراوانی ۰/۳۶ می‌باشد. هتروزیگوسیتی مارکر در همه‌ی اقوام بالای ۰/۷۰ می‌باشد که از میان آن‌ها قوم عرب و آذری بالاترین هتروزیگوسیتی به میزان ۰/۸۴/۸ را در میان اقوام مختلف و کل جمعیت ایرانی را دارا می‌باشند. در نهایت مقدار ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) محاسبه شده گویای اطلاع‌دهندگی شدید مارکر D9S1837 در اقوام مورد بررسی جمعیت ایرانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، مارکر D9S1837 را می‌توان به عنوان یک ابزار بسیار اطلاع‌دهنده به منظور تشخیص مولکولی و تشخیص پیش از تولد مرتبط با ناشنوایی غیرسندرومی اتوزومی مغلوب وابسته به ژن TMC1 به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: ناشنوایی غیرسندرومیک اتوزومی مغلوب، هتروزیگوسیتی، ژن TMC1، مارکر D9S1837، PCR.

### مقدمه:

تکلم و پس از تکلم وجود دارد (۵-۳). بیش از ۵۰ درصد موارد ناشنوایی مادرزادی وراثتی است (۶). ناشنوایی وراثتی خود بر اساس الگوی وراثتی تقسیم بندی می‌شود. گروه عمده‌ای از این موارد (بیش از ۸۰ درصد) دارای توارث اتوزوم مغلوب، ۱۵ تا ۲۰ درصد الگوی اتوزومی غالب و بقیه وابسته به X یا میتوکندریایی هستند (۷). اشکال غیر سندرمی ناشنوایی برای توارث اتوزومی مغلوب به صورت DFNB، برای توارث اتوزوم غالب به صورت DFNA و برای وابسته به X به صورت DFNX نشان داده می‌شوند (۸).

ناشنوایی مادرزادی متداول‌ترین نقص حسی در انسان است و بر اساس تخمین‌های جهانی شیوع آن ۱/۱۰۰۰ نوزادان می‌باشد (۱، ۲). ناشنوایی به چند روش تقسیم بندی می‌شود. در یک روش بر اساس علائم بالینی به انواع ناشنوایی هدایتی (اختلال گوش بیرونی یا میانی)، ناشنوایی حسی عصبی (اختلال گوش درونی) و ناشنوایی مخلوط (هدایتی و حسی عصبی) تقسیم می‌شود. در روش‌های دیگر به انواع سندرمی و غیر سندرمی دسته‌بندی می‌شود. بر اساس سن آغاز نیز ناشنوایی پیش از

جهش‌های ژن TMC1 یکی از شایع ترین جهش‌های مسئول ناشنوایی غیر سندرومیک با وراثت اتوزومی مغلوب در بسیاری از جمعیت‌های جهان از جمله جمعیت ایرانی می‌باشد (۹). ژن TMC1 کد کننده‌ی شبه پروتئین کانال غشائی است که در گوش میانی یافت می‌شود. این ژن بر روی کروموزوم ۹ (9q21.12) قرار دارد، شامل ۲۴ اگزون و پروتئینی به وزن ۸۷KD تولید می‌کند. تاکنون چندین جهش ژنی TMC1 را شناسایی کرده اند که یک فرم ناشنوایی غیر سندرومی را ایجاد کرده که DNFB7/NFB11 نامیده می‌شود و به صورت اتوزومی مغلوب به ارث می‌رسد (۱۰). بنابراین، مطالعه ژنتیکی لوکوس‌های اصلی درگیر در ARSHL به منظور روشن سازی سبب شناسی و مکانیسم‌های احتمالی بیماری‌زایی آن و تداخل درمانی آینده ضروری به نظر می‌رسد.

تشخیص مولکولی ناشنوایی بر اساس دو روش بررسی مستقیم جهش و بررسی غیر مستقیم توسط آنالیز پیوستگی انجام می‌شود. انتخاب روش در تشخیص‌های مولکولی به ویژگی‌های ژن مورد بررسی، بستگی دارد (۱۱). در بررسی مستقیم می‌توان به تعیین توالی ژنوم بیماران برای تشخیص جهش‌های ایجاد کننده بیماری اشاره کرد که برای ژن‌های با اندازه کوچک و دارای جهشی خاص با شیوع بالا مناسب می‌باشد (۱۲)؛ اما به دلیل اندازه بزرگ ژن TMC1 و پراکندگی جهش‌های مشاهده شده در نواحی مختلف ژن و نیز شیوع تقریباً یکسان این جهش‌ها در جمعیت ایرانی، روش مستقیم برای بررسی این جهش‌ها مناسب نمی‌باشد و بهتر است به منظور جلوگیری از اتلاف وقت و هزینه از روش غیر مستقیم استفاده گردد (۱۳). بنابراین به منظور مطالعه‌ی موشکافانه و غیر مستقیم جهش‌های متنوع در لوکوس‌های ژن‌های مسبب ناشنوایی نیازمند معرفی مارکرهای اطلاع دهنده‌ی قوی (strongly informative markers) در جمعیت منحصر به فرد ایرانی می‌باشیم. اولین قدم برای رسیدن به این هدف، بررسی‌های دقیق مارکرهای ژنتیکی وابسته به ژن در جمعیت‌های ایرانی است.

یکی از مارکرهای مورد استفاده در بررسی غیر مستقیم، توالی‌های تکراری پشت سر هم (Short tandem repeat= STR) می‌باشند (۱۴). چند شکلی‌های STR از تغییر در تعداد واحدهای توالی کوتاه ۲ تا ۴ نوکلئوتیدی که پشت سر هم تکرار شده است، ایجاد می‌شوند. در آنالیزهای پیوستگی جهت افزایش کیفیت لازم است که از مارکرهای اطلاع‌دهنده استفاده شود. اطلاع‌دهندگی یک مارکر توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (Polymorphism information content= PIC) محاسبه می‌گردد. مقدار PIC برای جایگاه‌های ژنی در جمعیت در تعادل هاردی-وینبرگ تعریف می‌شود که وابسته به تعداد آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مارکر می‌باشد و بنابراین در جمعیت‌های گوناگون به دلیل ساختار ژنتیکی متفاوت متغیر می‌باشد (۱۵، ۱۶). بنابراین جهت غربالگری بهینه جهش‌ها به روش غیر مستقیم، بایستی که مارکرهای مورد استفاده در جمعیت‌های مختلف ارزیابی شوند و مارکرهای اطلاع‌دهنده هر جمعیت به طور مجزا مشخص گردند.

در پایگاه داده‌ها STR های مختلفی در ناحیه ژن TMC1 معرفی شده است. یکی از آن‌ها مارکر درون ژنی D9S1837 می‌باشد که به علت پیوستگی آن به ژن TMC1 و هتروزیگوسیتی بالای این مارکر طبق گزارشات پایگاه‌ها و مطالعات قبلی جهت بررسی بیش‌تر در جمعیت ایرانی انتخاب گردید. در این مطالعه به بررسی خصوصیات و اطلاع‌دهندگی این مارکر در پنج قوم جمعیت ایرانی پرداخته شده و در نهایت نتایج آن مورد مقایسه قرار گرفته است.

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، پس از موافقت کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، از ۱۶۵ فرد شنوای غیر خویشاوند از پنج قومیت فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب به تعداد تقریباً مساوی از خانم‌ها و آقایان نمونه‌گیری انجام شد. از هر فرد ۱۰ میلی لیتر خون تام در لوله‌های حاوی یک میلی لیتر EDTA با

**جدول شماره ۱: برنامه بهینه شده نهایی****دستگاه ترموسایکلر برای مارکر D9S1837**

مرحله	دما (°C)	مدت	تعداد سیکل
۱	۹۶	۳ دقیقه	۱
۲	۹۶	۳۰ ثانیه	۷ سیکل تاچ داون
	۵۶ الی ۶۲	۳۰ ثانیه*	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۳	۹۶	۳۰ ثانیه	۲۷ سیکل معمولی
	۵۵	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۴	۷۲	۸ دقیقه	۱

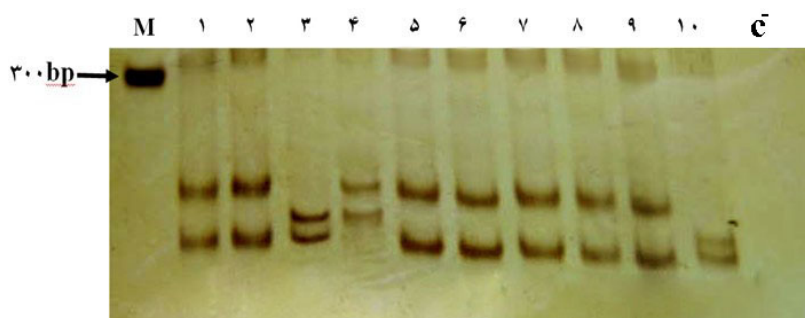
\*کم شدن یک درجه در هر سیکل

ترکیبات مورد نیاز واکنش PCR شامل: ۱ میکرولیتر از دو پرایمر (۱۰ پیکومول)، ۰/۱ میکرولیتر از DNA Polymerase Taq (۵ واحد در هر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از dNTP mix (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA buffer (۱۰X)، ۱ میکرولیتر از MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار) و ۲ میکرولیتر از DNA (۸۰ نانوگرم) که با ddH<sub>2</sub>O به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. حدود ۲/۵-۱ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱ بیس اکریل آمید به ۱۹ اکریل آمید) به مدت سه ساعت با ولتاژ ۲۰۰ ولت رانده شد و سرانجام ژل حاصله به روش نیترا ت نقره رنگ آمیزی گردید (تصویر شماره ۱)

غلظت ۰/۵ M تهیه شد. اطلاعات دموگرافیک آن‌ها ثبت و خون آن‌ها تا زمان شروع استخراج DNA ژنومی، در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

در این تحقیق DNA ژنومی با روش های محلول نمکی استخراج شد و کمیت حاصله به کمک دستگاه نانو دراپ ۱۰۰۰ (ایزوژن، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. کلیه مارکرهای STR مربوط به ژن TMC1، از طریق پایگاه داده UniSTS موجود در سامانه NCBI، به همراه درجه هتروزیگوسیتی و تنوع آللی در جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شد. سپس مارکر D9S1837 را که نوعی مارکر درون ژنی (واقع در اینترون ۱) با هتروزیگوسیتی بالا در سایر جمعیت‌ها می‌باشد جهت مطالعات بیش‌تر انتخاب گردید (۱۷).

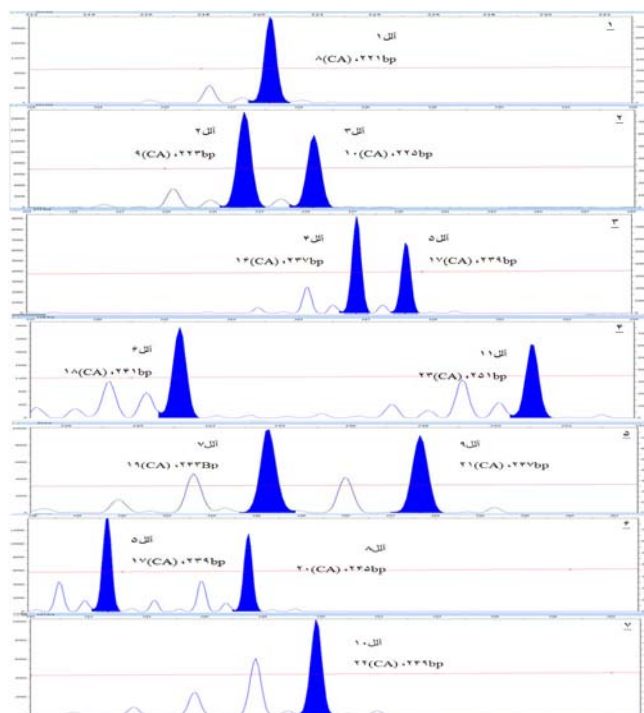
پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، از پایگاه داده UniSTS در سایت NCBI استخراج گردید. توالی پرایمر پیشرو 3'-CATGATGGTGGTCTCTGG-5' و پرایمر پیرو 5'-GGTGGGGCTCAAAGAGTAG-3' می‌باشد که با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) قطعاتی به طول متغیر ۲۰۵-۲۵۱ جفت باز تولید می‌کند (۱۸). واکنش PCR بر روی نمونه‌های DNA با برنامه Touch Down توسط دستگاه ترموسایکلر (آستک پی سی ۸۱۸، آمریکا) انجام شد (جدول شماره ۱).

**تصویر شماره ۱: نتیجه PCR مارکر D9S1837 بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪**

اندازه متفاوت آلل‌ها نشان دهنده اختلاف در تعداد توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی CA در نمونه‌های مختلف است. هر ۱۰ نمونه هتروزیگوت هستند و باندهای مورد انتظار در محدوده ۲۰۵-۲۵۱ جفت باز می‌باشند. M در ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.

خوانده شده و در نهایت نتایج به صورت نمودار در نرم افزار Peak Scanner نمایش داده شد. نتایج حاصل از نمودارها توسط نرم افزار GeneMarker HID STR تعیین ژنوتیپ و آلل بندی شدند که این آلل بندی با توجه به ساینز به دست آمده توسط الکتروفورز ژل موئینه انجام شد (تصویر شماره ۲).

پس از تأیید کیفیت باندها، محصولات با استفاده از دستگاه الکتروفورز موئینه فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین طول محصولات PCR توسط دستگاه الکتروفورز موئینه، انتهای ۵' پرایمر پیرو با رنگ فلورسنت 6-Fam (رنگ آبی) نشاندار شد که توسط دستگاه ABI Prism 3130



**تصویر شماره ۲: تعداد آلل های مارکر D9S1837 توسط نرم افزار GeneMarker HID STR**

نمونه های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ هتروزیگوت و نمونه های ۱ و ۷ هموزیگوت می باشند. در این ۷ نمونه ۱۱ آلل مشاهده شده در کلیه نمونه ها نشان داده شده است.

این نرم افزار با استفاده از آزمون دقیق فیشر به بررسی تعادل هاردی-وینبرگ می پردازد.

در پایان به کمک نرم افزار Microsatellite tools میزان PIC را محاسبه کرده و میزان اطلاع دهنده گی مارکر مورد نظر در اقوام مختلف بررسی شد (۲۱). اطلاع دهنده گی یک مارکر جهت استفاده در آنالیز پیوستگی توسط فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) اندازه گیری می شود. این فاکتور برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت تعریف می شود و به تعداد و فراوانی آلل ها و

پس از تعیین ژنوتیپ افراد آنالیز آماری نتایج شامل محاسبه فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار فنوتیپ های هموزیگوت و هتروزیگوت و همچنین بررسی تعادل هاردی-وینبرگ (HWE) با استفاده از پایگاه GenePop انجام شد (۱۶). آزمون فیشر یکی از روش های تعادل هاردی-وینبرگ می باشد. آزمون فیشر وقتی که آلل های نادر وجود دارد مناسب است و بنابراین بایستی برای مارکرهایی که تعداد زیادی آلل دارند (مانند لوکوس های ریزماهواره) استفاده شود (۱۹، ۲۰).

هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است. مقدار PIC بزرگتر از ۰/۷ نشان‌دهنده اطلاع‌دهندگی شدید مارکر در آنالیز پیوستگی برای ژن پیوسته به آن است. اگر مقدار PIC مابین ۰/۴۴ و ۰/۷ باشد نشان‌دهنده اطلاع‌دهندگی متوسط مارکر است و در صورتی که این مقدار به کوچکتر از ۰/۴۴ برسد اطلاع‌دهندگی مارکر ضعیف به شمار می‌آید.

### یافته‌ها:

محصول PCR نمونه‌های افراد شنوای غیر خویشاوند مارکر D9S1837 ابتدا با روش

الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد مشاهده و ارزیابی شد و با اطمینان از وجود محصولات PCR مناسب با استفاده از الکتروفورز فلورسنت موئینه تعیین ژنوتیپ و آلل‌بندی شدند. مطابق با تصویر شماره ۱ آلل‌بندی‌ها به دو صورت تعداد جفت باز طول محصولات و تعداد تکرارهای CA بیان شده است. نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود ۱۱ آلل در جمعیت ایرانی می‌باشد. از میان تمامی آلل‌ها قوم فارس ۹ آلل، آذری ۱۰ آلل، ترکمن ۹ آلل، گیلک ۱۱ آلل و عرب ۱۱ آلل را دارا بودند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: آلل‌ها و درصد فراوانی آللی مارکر D9S1837 در پنج قوم از جمعیت ایرانی

شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
آلل	۲۲۱	۲۲۳	۲۲۵	۲۳۷	۲۳۹	۲۴۱	۲۴۳	۲۴۵	۲۴۷	۲۴۹	۲۵۱
قوم	۸CA	۹CA	۱۰CA	۱۶CA	۱۷CA	۱۸CA	۱۹CA	۲۰CA	۲۱CA	۲۲CA	۲۳CA
فارس	۹/۳۸	۱۰/۹۴	۱۲/۵۰	۱/۵۶	۳۱/۲۵	۲۳/۴۴	۰	۷/۸۱	۱/۵۶	۰	۱/۵۶
آذری	۴/۵۵	۱۰/۶۱	۱۰/۶۱	۷/۵۸	۳۶/۳۶	۱۵/۱۵	۶/۰۶	۱/۵۲	۰	۴/۵۵	۳/۰۳
ترکمن	۶/۰۶	۱۸/۱۸	۱۵/۱۵	۱/۵۲	۳۴/۸۵	۱۶/۶۷	۳/۰۳	۳/۰۳	۰	۰	۱/۵۲
گیلک	۶/۰۶	۹/۰۹	۹/۰۹	۴/۵۵	۳۷/۸۸	۲۴/۲۴	۱/۵۲	۳/۰۳	۱/۵۲	۱/۵۲	۱/۵۲
عرب	۳/۰۳	۱۵/۱۵	۷/۵۸	۹/۰۹	۴۰/۹۱	۱۰/۶۱	۱/۵۲	۷/۵۸	۱/۵۲	۱/۵۲	۱/۵۲
کلیه اقوام جمعیت ایرانی	۵/۷۶	۱۳/۳۳	۱۱/۲۱	۴/۸۵	۳۶/۳۶	۱۷/۵۸	۲/۴۲	۴/۲۴	۱/۲۱	۱/۵۲	۱/۵۲

ردیف اول شماره آلل را نشان می‌دهد. ردیف دوم طول قطعه DNA تکثیر شده را بر حسب جفت باز نشان می‌دهد. ردیف سوم تعداد تکرار دی نوکلئید CA را نشان می‌دهد.

در نهایت با تعیین ژنوتیپ افراد، درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای هر قوم به طور جداگانه و همچنین به طور کلی برای جمعیت ایرانی توسط نرم‌افزار GenePop محاسبه شد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده مارکر D9S1837 با استفاده از پایگاه GenePop

قوم	هتروزیگوسیتی (درصد)	هموزیگوسیتی (درصد)	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده
فارس	۸۱/۷	۶۸/۸	۱۸/۳	۳۱/۲	۱۸/۳	۳۱/۲
آذری	۸۲/۰	۸۴/۸	۱۸/۰	۱۵/۲	۱۸/۰	۱۵/۲
ترکمن	۸۰/۱	۷۵/۸	۱۹/۹	۲۴/۲	۱۹/۹	۲۴/۲
گیلک	۷۸/۶	۸۱/۸	۲۱/۴	۱۸/۲	۲۱/۴	۱۸/۲
عرب	۷۸/۹	۸۴/۸	۲۱/۱	۱۵/۲	۲۱/۱	۱۵/۲
کلیه اقوام ایرانی	۸۰/۰	۷۸/۸	۲۰/۰	۲۱/۲	۲۰/۰	۲۱/۲

تبادل هاردی- وینبرگ برای جایگاه مارکر D9S1837 در اقوام مختلف کشور و همچنین برای جمعیت ایرانی با استفاده از نرم افزار GenePop مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نمایانگر مقدار P بزرگتر از ۰/۰۵ در تمامی اقوام مورد بررسی می باشد. سرانجام به این علت که هر پنج قوم فارس، آذری، ترکمن، گیلک و عرب در جایگاه ژنی مارکر در تبادل هاردی- وینبرگ قرار داشتند. با توجه به داده های حاصل از فراوانی آلل ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مقدار PIC با استفاده از نرم افزار Microsatellite Tools در اقوام مورد بررسی، محاسبه شد (جدول شماره ۴).

#### جدول شماره ۴: تبادل هاردی وینبرگ و مقدار PIC

برای مارکر D9S1837 در جمعیت ایرانی و اقوام آن

قوم	تبادل هاردی وینبرگ ( <sup>*</sup> P)	PIC
فارس	۰/۷۳۶۷	۷۷/۹
آذری	۰/۰۶۶۹	۷۸/۹
ترکمن	۰/۷۹۵۹	۷۶/۱
گیلک	۰/۸۷۴۷	۷۴/۷
عرب	۰/۸۱۸۵	۷۵/۶
کلیه اقوام ایرانی	۰/۱۷۰۵	۷۷/۷

\* بر اساس آزمون فیشر، PIC = ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی.

#### بحث:

این تحقیق جهت تعیین ویژگی های مارکر D9S1837 در جمعیت ایرانی و قوم های مختلف آن صورت گرفته است. این بررسی ما را قادر به انتخاب مارکرهای مناسب به منظور تشخیص مولکولی جهش های ژن TMC1 مسئول ناشنوایی به روش غیر مستقیم می نماید و در پیشرفت روش های تشخیصی در جمعیت ایرانی موثر می باشد.

در مطالعه حاضر از بین ۱۱ آلل شناسایی شده بر روی مارکر D9S1837، آلل ۵ که دارای طول محصول PCR ۲۳۹ جفت باز با فراوانی ۳۶/۳۶٪ و آلل ۹ که دارای طول محصول PCR ۲۴۷ جفت باز با فراوانی ۱/۲۱٪ می باشند، به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در

جمعیت ایرانی نشان دادند (جدول شماره ۲). بر اساس اطلاعات پایگاه داده ی UniSTS آلل های این مارکر دارای محدوده ی محصول PCR ۲۵۱-۲۰۵ جفت باز می باشند (۱۶). با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه طول آلل ها در جمعیت ایرانی از ۲۲۱ جفت باز آغاز شده و در نتیجه آلل های کوتاه تر از ۲۲۱ جفت باز را دارا نمی باشد و براساس نتایج مطالعه ی حاضر برخلاف گزارشات دیگر جمعیت ها آلل های ۲۲۷، ۲۲۹، ۲۳۱، ۲۳۳ و ۲۳۵ در جمعیت ایرانی مشاهده نشد.

این مارکر در قوم فارس نشان دهنده وجود ۹ آلل از ۱۱ آللی بود که در جمعیت ایرانی دیده شد و در این میان آلل ۲۳۹ با فراوانی ۳۱/۲۵ درصد دارای بیشترین فراوانی و آلل های ۲۳۷، ۲۴۷ و ۲۵۱ با فراوانی ۱/۵۶ درصد دارای کمترین فراوانی هستند. بررسی ها بر روی افراد قوم آذری نیز حاکی از وجود ۱۰ آلل هستند که آلل ۲۳۹ و ۲۴۵ به ترتیب با درصد ۳۶/۳۶ و ۱/۵۲ شایع ترین و کمیاب ترین آلل ها به شمار می آیند و بررسی ژنوتیپ های این قوم حاکی از فقدان آلل ۲۴۷ مشاهده شده در جمعیت ایرانی هستند. قوم ترکمن ۹ آلل را نشان دادند که آلل ۲۳۹ با درصد ۳۴/۸۵ شایع ترین و آلل ۲۳۷ و ۲۵۱ با درصد ۱/۵۲ کمیاب ترین فراوانی را دارند. قوم گیلک دارای همه ۱۱ آلل مشاهده شده در جمعیت ایرانی بود و در میان آلل ها، آلل ۲۳۹ با فراوانی ۳۷/۸۸ درصد شایع ترین و چهار آلل ۲۴۳، ۲۴۷، ۲۴۹ و ۲۵۱ با فراوانی ۱/۵۲ درصد کمیاب ترین آلل ها محسوب می شوند. در نهایت، در قوم عرب آلل ۲۳۹ با فراوانی ۴۰/۹۱ درصد بیشترین و آلل های ۲۴۳، ۲۴۷، ۲۴۹ و ۲۵۱ با فراوانی ۱/۵۲ دارای کمترین درصد فراوانی می باشند.

درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر D9S1837 به طور کلی در جمعیت ایرانی ۷۸/۸٪ است که کمی کمتر از درصد هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۸۰٪) می باشد. درصد هتروزیگوسیتی گزارش شده برای مارکر D9S1837 توسط Mammalian Genotyping Service

۷۴٪ می‌باشد که کمتر از درصد هتروزیگوسیتی به دست آمده برای جمعیت ایرانی در این مطالعه است (۲۲). بالاترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده با درصد ۸۴/۸ متعلق به قوم آذری و عرب و پایین‌ترین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده با درصد ۶۸/۸ متعلق به قوم فارس می‌باشد.

پس از تخمین فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی داده‌ها، برقراری تعادل هاردی-وینبرگ نیز توسط نرم‌افزار GenePop بررسی شد. در این آزمون فرض صفر بر مبنای وجود تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت ایرانی و اقوام مورد بررسی قرار دارد. در صورتی که مقدار P حاصله کوچکتر از ۰/۰۵ شود فرضیه صفر مبنی بر وجود تعادل هاردی-وینبرگ رد می‌شود (۲۳). مطابق با جدول شماره ۴ مقدار P بزرگتر از ۰/۰۵ در جمعیت ایرانی برای مارکر D9S1837 حاکی از وجود تعادل هاردی-وینبرگ در این جمعیت می‌باشد. مقدار P برای پنج قوم مورد بررسی نیز بزرگتر از ۰/۰۵ تخمین زده شد. بنابراین این اقوام برای جایگاه ژنی مارکر D9S1837 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار دارند.

بر اساس نتایج به دست آمده مقدار PIC برای کلیه اقوام بررسی شده در جمعیت ایرانی بالاتر از ۰/۷ است در نتیجه مارکر D9S1837 برای این پنج قوم و

به طور کلی جمعیت ایرانی جهت بررسی جهش‌های ژن TMC1 به روش آنالیز پیوستگی دارای اطلاع‌دهندگی قوی است. در میان اقوام مختلف شدیدترین اطلاع‌دهندگی مارکر D9S1837 مربوط به قوم آذری است.

### نتیجه‌گیری:

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مارکر D9S1837 واقع در ناحیه ژن TMC1 با بیش از ۸ آلل و هتروزیگوسیتی ۷۸/۸ درصد و همچنین مقدار PIC ۰/۷۷۷ در جمعیت ایرانی به عنوان یک مارکر با اطلاع‌دهندگی شدید جهت تشخیص‌های مولکولی ناشنوائی غیر سندرومیک مرتبط با ژن TMC1 با توارث اتوزومی مغلوب به روش آنالیز پیوستگی در جمعیت ایرانی معرفی می‌گردد.

### تشکر و قدردانی:

در پایان از معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که با تصویب این طرح، هزینه‌های انجام مطالعه را پرداخت نمودند تشکر فراوان می‌گردد.

### منابع:

1. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res.* 2005;203(1-2):88-93.
2. Ram Shankar M, Girirajan S, Dagan O, Shankar HR, Jalvi R, Rangasayee R, et al. Contribution of connexin 26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genet.* 2003; 40(5): e68.
3. Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics. *Mutat Res.* 2009; 681(2): 189-96.
4. Brownstein Z, Avraham KB. Deafness genes in Israel: implications for diagnostics in the clinic. *Pediatr Res.* 2009; 66(2): 128-134.
5. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *J Med Dent Sci.* 2010; 57(1): 1-10.
6. Makishima T, Kurima K, Brewer CC. Early onset and rapid progression of dominant nonsyndromic DFNA36 hearing loss. *Otol Neurotol* 2004; 25 (5): 714-9.
7. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 630: 16-31.
8. Mukherjee M, Phadke S, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Indian J Hum Genet.* 2003; 9(2): 40-50.

9. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic linkage Analysis of 15 DFNB Loci in A group of Iranian families with Autosomal recessive hearing loss. Iran J Public Health. 2011; 40(2): 34-48.
10. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, et al. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. Nat Genet. 2002; 30(3): 277-84.
11. Zhao H, Pfeiffer R, Gail MH. Haplotype analysis in population genetics and association studies. Pharmacogenomics. 2003; 4(2): 171-178.
12. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, et al. Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. Hum Gene. 2000; 106(1): 40-44.
13. Yazdanpanahi N, Chaleshtori MH, Tabatabaiefar MA, Noormohammadi Z, Farrokhi E, Najmabadi H, et al. Two novel SLC26A4 mutations in Iranian families with autosomal recessive hearing loss. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2012; 76(6): 845-50.
14. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The international HapMap project. Nature. 2003; 426(6968): 789-96.
15. Elahi E, Kumm J, Ronaghi M. Global genetic analysis. J Biochem Mol Biol. 2004; 37(1): 11-27.
16. Hildebrand CE, David C, Torney WRP, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Sci. 1992; 20(20): 100-102.
17. UniSTS Database [database on the Internet. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>].
18. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered. 1995; 86(3): 248-9.
19. Weir BS. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. 1<sup>st</sup> ed. Massachusetts: Sinauer associates Inc; 1996.
20. Engels WR. Exact tests for Hardy-Weinberg proportions. Genetics. 2009; 183(4): 1431-41.
21. Park SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. [dissertation]. Ireland: University of Dublin. 2001.
22. Mammalian Genotyping Service [database on the Internet]. [cited. Available from: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>].
23. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992; 48(2): 361-72.



## Genetic variation of D9S1837 Marker located at TMC1 gene in Iranian population

Motamedi S<sup>1</sup>, Hashemzadeh-Chaleshtori M<sup>1</sup>, Mojtavavi-Naeini M<sup>2</sup>, Teimori H<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; <sup>2</sup>Biology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 4/May/2014      Accepted: 11/Aug/2014

**Background and aims:** TMC1 gene mutations are one of the most common causes of autosomal recessive Non-syndromic hearing loss (ARNSHL) in different populations. In view of large size of the gene and the large number of identified mutations in TMC1, use of polymorphic markers is suggested for carrier detection and prenatal diagnosis. The aim of this study was to evaluate informativeness of D9S1837 CA repeat STR marker in five different ethnic of Iranian population.

**Methods:** In this descriptive analytical study the locus of D9S1837 within TMC1 gene was genotyped by polymerase chain reaction (PCR), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and fluorescent capillary electrophoresis, respectively. Allelic frequency, heterozygosity rate and genotyping data from 165 unrelated healthy individuals were estimated by Gene Marker HID Human STR Identity software, Gene Pop program and Microsatellite Tools software.

**Results:** The result obtained through Gene Pop program indicated the presence of 11 alleles of D9S1837 marker in the Iranian population. The most frequent allele was computed for 239 bp with 36% frequency. Heterozygosity of all investigated ethnic groups was above 70%, but among all Arab and Azeri ethnic groups had the highest heterozygosity (84.8%). The data of PIC value demonstrated that the D9S1837 marker was found highly informative in the examined population.

**Conclusion:** According to the results of this study, D9S1837 marker could be used as an informative tool for carrier detection and prenatal diagnosis of TMC1 based ARNSHL by linkage analysis in Iranian population.

**Key words:** ARNSHL, Heterozygosity, TMC1 gene, D9S1837 marker, PCR.

**Cite this article as:** Motamedi S, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Mojtavavi-Naeini M, Teimori H. Genetic variation of D9S1837 Marker located at TMC1 gene in Iranian population. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 16(6): 75-83.

---

\*Corresponding author:

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983833335654, E-mail: hosseintimm@yahoo.com